

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.06.011

呼吸道合胞病毒核酸分型检测性能验证^{*}

李广波, 轩乾坤, 羽晓瑜, 杨思敏[△]
(同济大学附属东方医院检验科, 上海 200123)

[摘要] **目的** 评价呼吸道合胞病毒(RSV)核酸分型检测试剂盒的分析性能。**方法** 留取呼吸道合胞病毒抗原检测阳性和阴性的咽拭子,从咽拭子洗脱液提取核酸,用 RSV RNA 分型检测试剂盒检测。核酸检测的扩增产物送测序公司测序,测序结果与 NCBI 标准序列比对确认为 RSV 核酸并分型,测序结果与待评价试剂盒检测结果比对评价正确度。取 RSV 核酸检测弱阳性的样本,每天重复检测 4 次,连续检测 5 d,以检测 Ct 值评价检测精密度。将 RSV A 型和 B 型的 RNA 标准品稀释到检测限,验证检测下限。取微生物室咽拭子培养常见病原菌的纯培养菌液,验证检测试剂的交叉无反应性。**结果** 通过实验验证检测试剂盒的符合率为 100%,批内、批间精密度(CV)≤5%,检测下限为 100 copy/mL,与常见同部位病原菌无交叉反应。**结论** RSV 核酸检测试剂和仪器组成的检测系统各项质量指标符合试剂说明书的质量参数,可开展临床标本的检测,为临床早诊断、早治疗提供重要依据。

[关键词] 呼吸道合胞病毒;核酸分型检测;性能验证

[中图法分类号] R446 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)06-0910-04

Performance validation of respiratory syncytial virus nucleic acid typing kit^{*}

LI Guangbo, XUAN Qiankun, YU Xiaoyu, YANG Simin[△]

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated East Hospital, Tongji University, Shanghai 200123, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the analytical performance of respiratory syncytial virus(RSV) nucleic acid typing test kit. **Methods** The positive and negative pharyngeal swabs for RSV antigen were retained. The nucleic was extracted from pharyngeal swabs elution and detected by using the RSV RNA genotyping kit. The amplified products of nucleic acid detection were sent to the sequencing company for sequencing. The sequencing results were identified as RSV nucleic acid and typed by the alignment with NCBI standard sequence. The sequencing results were compared with the detected results of the kit to be evaluated for evaluating the accuracy. The weakly positive RSV nucleic acid samples were repeatedly tested for 4 times a day during consecutive 5 d. The detection precision was evaluated by Ct value. The RSV RNA standards of type A and B was diluted to the detection limit for verifying the lower limit of detection. The pure culture liquid of common pathogenic bacteria in pharyngeal swab was used to verify the cross-reactivity of detection reagents. **Results** The coincidence rate of the test kit was 100%. The precision of in-batch and inter-batch detection were ≤5%. The detection lower limit of the kit was 100 copy/mL, which had no cross reaction with common pathogens at the same site. **Conclusion** The various quality indexes of the detection system composed of RSV nucleic acid detection reagent and instrument conform to the quality parameters of reagent instruction, which can be used to conduct the detection of clinical samples to provide the important basis for clinical early diagnosis and early treatment.

[Key words] respiratorysyncytial virus;nucleic acid typing detection;performance verification

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是儿童急性呼吸道感染的重要病原体,临床表现可以从轻微的急性上呼吸道感染或中耳炎到严重的潜在危及生命的下呼吸道感染^[1]。慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)目前是全球患者第四大死亡原因^[2]。常规病原体抗

^{*} 基金项目:上海市浦东新区卫生系统重点学科建设资助项目(PWZxk2017-09)。 作者简介:李广波(1978—),主管技师,硕士,主要从事病原体的分子检测、个体化用药分子机制的研究。 [△] 通信作者,E-mail:yang_kisa@hotmail.com。

原胶体金检测方法存在假阳性和假阴性,灵敏度较低,随着聚合酶链反应(PCR)检测试剂的出现,RSV 越来越受到关注。RSV 基于 G 和 F 抗原的差异可分为 A 和 B 两个亚型^[3-4]。两个亚型在流行病学特征、疾病症状等方面具有一定的差异,因此对 RSV 的分型检测是临床诊治的重要基础,PCR 从基因水平进行分型检测,为分型诊断和治疗提供了重要依据。本研究参照《CNAS-CL02-A009 医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》对上海之江生物科技股份有限公司生产的 RSV A、B 分型核酸检测试剂盒进行性能验证。

1 材料与方法

1.1 材料

选取 2018 年 1—4 月本院住院患者检测 RSV 抗原的咽拭子标本,采用免疫荧光法进行抗原分型检测,共检测 40 份标本,其中抗原检测阳性标本 15 份,阴性标本 25 份。RSV 感染患者经临床抗病毒治疗有效;检测结果为阴性的患者无病毒感染症状,未进行抗病毒治疗。

1.2 检测方法

1.2.1 核酸提取及检测

咽拭子标本中加入 500 μ L 生理盐水涡旋洗脱,洗脱液使用上海之江公司的全自动核酸提取仪 EX3600 及配套核酸提取试剂盒,按照说明书提取核酸,当天检测或—80 $^{\circ}$ C 冰箱暂存。使用 RSV A、B 分型核酸检测试剂盒及上海宏石 SLAN96P 荧光定量聚

合酶链反应(PCR)仪检测核酸,程序设置按照试剂说明书操作。

1.2.2 符合率/正确度验证

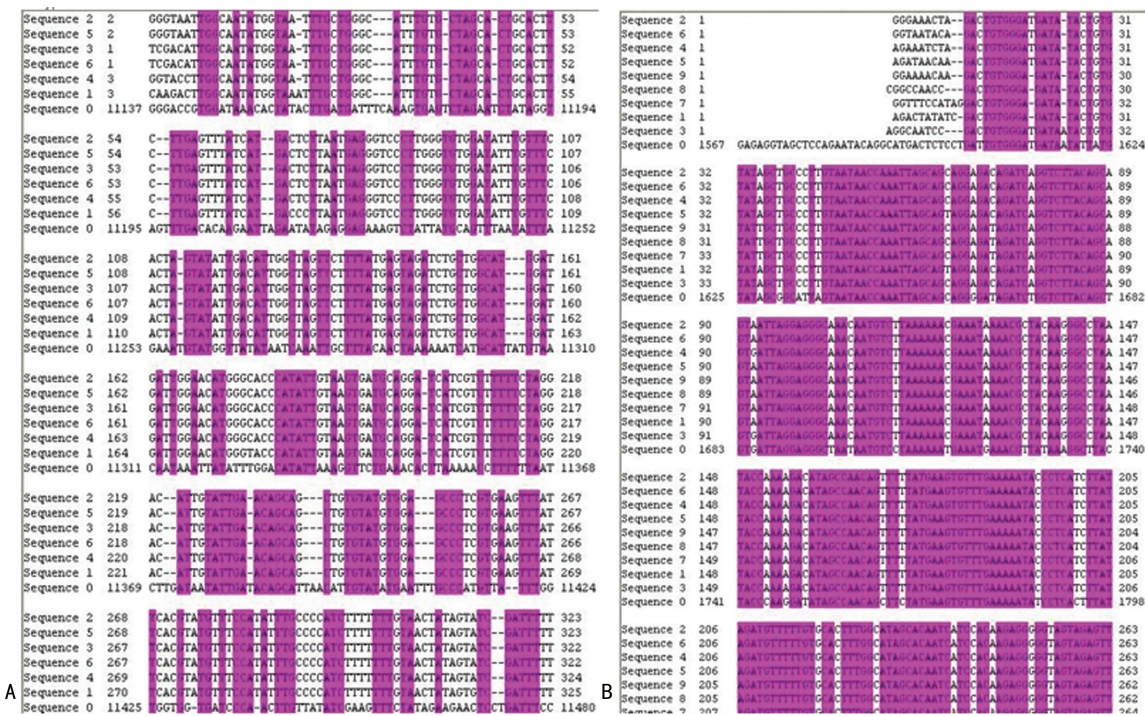
从患者咽拭子标本中提取核酸,检测 RSV 核酸的阴阳性及 A、B 分型,记录检测结果,扩增产物送上海美吉生物医药科技有限公司做高通量测序。测序结果与 NCBI 标准序列比对,确认是否为 RSV 核酸及其分型。将待评价试剂盒检测结果与测序结果进行比对,评价其正确度。以测序结果为正确结果,统计检测符合率。检测结果及分型符合率大于或等于 90%为合格。

1.2.3 精密度验证

分别取 1 份 RSV A 型和 B 型阳性标本混合并稀释到 CT 值弱阳性的混合标本、1 份 RSV A 型和 B 型核酸检测均为阴性的标本,每次重复检测 4 次,连续检测 5 d,共进行 20 次检测,记录结果,如为阳性则记录相应 Ct 值。检测结果阴性、阳性符合率大于或等于 90%,且其阳性标本的批内和批间 Ct 值的 CV 值小于或等于 5%为合格。

1.2.4 检测下限验证

取 RSV A 型和 B 型核酸定量标准品,通过检测 OD₂₆₀ 复核厂家测定浓度,并稀释到 1 000 copy/mL 和 100 copy/mL 2 个浓度,分别重复 4 次。按照试剂盒说明书标注检测下限,1 000 copy/mL 检测结果均应为对应分型阳性,分型符合率 100%为合格。



A:RSV A 型;B:RSV B 型。

图 1 扩增产物测序与标准序列比对



A:RSV A 型核酸 Ct 值及扩增曲线;B:RSV B 型核酸 Ct 值及扩增曲线;C:检测内标 Ct 值及扩增曲线。

图 2 干扰实验

1.2.5 干扰实验验证

取微生物实验室纯培养并鉴定为肺炎链球菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌等呼吸道常见的感染病原体,用生理盐水配制成悬液混入符合率验证阴性的标本洗脱液。用核酸自动提取仪提取核酸后,用 RSV A、B 分型核酸检测试剂盒进行检测,连续检测 3 次。检测结果是内标有效的阴性即对 RSV A、B 分型核酸检测无干扰为合格。

2 结 果

2.1 符合率/正确度验证结果

测序结果与 Gene Bank 标准序列比对分析,15 份扩增检测阳性的标本分型结果与测序分型结果一致。检测分型为 A 型 6 份、B 型 9 份,与测序结果比对分型符合率为 100%,大于 90%,验证通过。

2.2 精密度验证结果

批内精密度验证结果统计见表 1,RSV A 型和 RSV B 型的 5 批次实验的批内精密度均符合 CV≤5%的要求,验证通过。

表 1 批内精密度验证结果						
组别	项目	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
RSV A 型	$\bar{x}$	30.85	30.68	31.17	31.88	30.30
	s	0.14	0.23	0.10	0.11	0.21
	CV	0.45%	0.75%	0.32%	0.34%	0.70%
RSV B 型	$\bar{x}$	30.75	30.50	31.17	32.01	29.94
	s	0.06	0.09	0.06	0.19	0.18
	CV	0.19%	0.30%	0.20%	0.60%	0.61%
验证结果		验证通过	验证通过	验证通过	验证通过	验证通过

RSV B 型的批间精密度均符合 CV≤5%的要求,验证通过。

表 2 批间精密度验证结果		
项目	RSV A 型	RSV B 型
$\bar{x}$	30.97	30.87
s	0.57	0.72
CV	1.83%	2.33%
验证结果	验证通过	验证通过

2.3 检测下限验证结果

1 000、100 copy/mL 的 RSV A 型和 RSV B 型的检测结果均为试剂盒说明书要求的 Ct≤38,即全部检测为阳性,且 2 个浓度梯度的 Ct 差约为 3,见表 3,符合扩增规律,验证通过。

表 3 检测下限结果(Ct 值)		
组别	RSV A 型标准品	RSV B 型标准品
1 000 copy/mL	30.67	32.66
	31.15	32.5
	30.65	32.76
	30.68	32.59
100 copy/mL	33.36	35.45
	33.03	34.42
	34.55	35.34
	33.36	34.82

2.4 干扰实验验证结果

肺炎链球菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的悬液混入符合率验证阴性的标本洗脱液,提取模板检测结果均为

内标有效($Ct < 22$)的阴性结果,即这些呼吸道常见病原体对 RSV A 型和 RSV B 型的标本的提取和检测无干扰,详细检测结果见图 2。

3 讨 论

CLIA 性能验证特指使用某特定检测试剂或系统的实验室按照所提供的试剂盒或检测系统说明书使用时,能重现生产厂家所宣称的检测性能^[5]。本研究根据 2018 年 3 月开始实施的《CNAS-CL02-A009 医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》及上海市临床检验中心对分子诊断项目性能验证内容的要求,从准确度、精密度、最低检出限和抗干扰能力 4 个方面进行评估,可供其他以拭子为标本类型的病原体核酸检测项目作为参考。

病毒是婴幼儿社区获得性肺炎(communitary acquired pneumonia, CAP)的常见病原体,也是儿童 CAP 病原学区别于成人的重要特征,RSV 是引起儿童 CAP 的首位病毒^[6-7]。呼吸道标本病毒抗原的快速检测是医疗机构病毒感染早期诊断的主要方法之一,本研究所用标本来源于进行 RSV 抗原检测的咽拭子。病毒检测传统金标准是病毒培养,限于设备、技术等问题,临床很少开展。本次验证的正确度验证以测序结果为标准判断检测的正确度。以测序为正确度判断标准常用于难培养病原体核酸检测及人类基因检测的性能验证。

目前较成熟的 RSV 检测方法包括免疫荧光法检测呼吸道脱落上皮细胞内的病毒抗原、酶免疫法或金标法检测呼吸道分泌物中的病毒特异性抗原等^[8-10]。这些方法简便,设备要求低,适合临床实践中病毒感染的早期快速诊断,对临床决策指导合理用药意义较大,但标本来源与质量、取材时机都很大程度上影响了检测结果^[11-12]。通过分子生物学方法尤其是反转录 PCR(RT-PCR)检测呼吸道分泌物中的病毒特异性基因片段,具有很高的灵敏度、特异度,有早期诊断价值^[9,13-14]。因其灵敏度较高可部分避免因取材质量引起的抗原检测的假阴性,受到临床的广泛认可。

综上所述,上海之江公司的呼吸道合胞病毒(RSV)A、B 分型核酸检测试剂盒在上海宏石公司 SLAN-96P 核酸扩增仪分型检测 RSV 时性能良好,符合临床分子生物学扩增检验的要求,可为临床提供病原学诊断的可靠依据。

参考文献

[1] SHI T,MCLEAN K,CAMPBELL H,et al. Aetiological role of common respiratory viruses in acute lower respiratory infections in children under five years:a systematic review and meta-analysis[J]. J Glob Health,2015,5(1):10408.

[2] ROTH G A,ABATE D,ABATE K H,et al. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories,1980-2017:a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. Lancet,2018,392(10159):1736-1788.

[3] SONG J,WANG H,NG T I,et al. Sequence analysis of the fusion protein gene of human respiratory syncytial virus circulating in china from 2003 to 2014[J]. Sci Rep,2018,8(1):17618.

[4] KIMURA H,NAGASAWA K,KIMURA R,et al. Molecular evolution of the fusion protein (F) gene in human respiratory syncytial virus subgroup B [J]. Infect Genet Evol,2017,52:1-9.

[5] KILLEEN A A, LONG T, SOUEM R, et al. Verifying performance characteristics of quantitative analytical systems: calibration verification, linearity, and analytical measurement range[J]. Arch Pathol Lab Med,2014,138(9): 1173-1181.

[6] RUVINSKY R O, REARTE A, KUPERVASER J, et al. Community acquired pneumonia incidence among children less than 5 years of age in Concordia, Argentina: vaccination impact[J]. Rev Panam Salud Publica,2018,42:e167.

[7] JIANG W, WU M, ZHOU J, et al. Etiologic spectrum and occurrence of co-infections in children hospitalized with community-acquired pneumonia [J]. BMC Infect Dis,2017,17(1):787.

[8] 姜梨梨,王瑞芳,周海群,等. 亳州地区 2 846 例儿童急性呼吸道感染病原体 IgM 抗体检测结果分析[J]. 重庆医学,2017,46(25):3569-3570.

[9] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 儿童社区获得性肺炎管理指南(2013 修订)(上)[J]. 中华儿科杂志,2013,51(10):745-752.

[10] BARON E J, MILLER J M, WEINSTEIN M P, et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)[J]. Clin Infect Dis,2013,57(4):e22-121.

[11] IP D K, LAU L L, LEUNG N H, et al. Viral shedding and transmission potential of asymptomatic and paucisymptomatic influenza virus infections in the community [J]. Clin Infect Dis,2017,64(6):736-742. (下转第 917 页)